



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**COPIE OFFICIELLE**

RECEIVED

88 SEP -7 AM 8:39

GROUP 180

LE DOCUMENT CI-ANNEXÉ EST LA COPIE CERTIFIÉE CONFORME,  
D'UNE DEMANDE DE TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
ENREGISTRÉE A L'INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE.

PUBLIÉ

LE TITRE A ÉTÉ [REDACTED] LE...

23 Mars 1988

ÉTABLIE A PARIS, LE 23 MARS 1988

Pour le Chef de Service  
Directeur de l'Institut national  
de la propriété industrielle

A handwritten signature in dark ink, likely belonging to the Director of the Institut National de la Propriété Industrielle.

Y. CAMBON

DEMANDE DE  
(voir case cochée)☒ BREVET D'INVENTION☐ CERTIFICAT D'ADDITION☒ CERTIFICAT D'UTILITÉ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE☐ TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN.

COULEUR POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DÉPÔT PO 75 33

DUPLICATA DE LA REQUÊTE

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION  
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

CABINET PLASSERAUD

84, rue d'Amsterdam  
75009 PARISDATE DE  
REMISE  
DES PIÈCES 20 SEP 1982DATE DE  
DÉPÔT

20 sept 82

N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL 82 15804RÉFÉRENCE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE:

CHP/162 82 01

DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO  
DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE:

280 67 77

1) TITRE DE L'INVENTION

Nouveaux disaccharides formés de motifs à structure acide  
D-glucuronique et D-glucosamine et procédé pour leur  
préparationNOMBRE DE  
REVENDICATIONS:

2) DEMANDEUR: NOM ET PRÉNOMS OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE:

N° SIRENE, LE CAS ÉCHÉANT

1

CHOAY S.A.

3) NATIONALITÉ:

Française

4) ADRESSE COMPLÈTE:

48, avenue Théophile-Gautier  
75782 PARIS CEDEX 16

PAYS

FRANCE

5) INVENTEUR

LE DEMANDEUR EST  
L'INVENTEUR6) LE DEMANDEUR REQUIERT QUE  
L'ÉTABLISSEMENT DE L'AVIS  
DOCUMENTAIRE SOIT DIFFÉRÉLE DEMANDEUR REQUIERT LE  
BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ  
DE LA TAXE D'AVIS DOCUMENTAIRELE DEMANDEUR BÉNÉFICIE  
POUR L'INVENTION CONCERNÉE, D'UNE DÉCISION  
DE RÉDUCTION DES TAUX DE TAXE

7) DÉCLARATION DE PRIORITÉ

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation  
(Article 20 de la Loi n° 590 du 18 mai 1958 modifiée et articles 42 et 43  
du Décret n° 1373 du 22 mars 1979)Brevet déposé le 29-9-82  
modifiée et articles 42 et 43  
du Décret n° 1373 du 22 mars 1979

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE:

N°

DATE DE DÉPÔT:

ADDITIONS ANTERIEURES: 1° N°

2° N°

3° N°

4° N°

SIGNATURE  
DU DEMANDEUR  
OU  
DE SON  
MANDATAIRE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT  
DE LA DEMANDE À L'INPI

274 15/12

CODE POSTAL DU LIEU DE DEPOT

DEPOT POSTAL 75 . 99

2 533 220

82 15804

DEBUT DOCUMENT A1 DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION  
20 SEPTEMBRE 1982  
12 OU 23/03/84

C07H 15/12 ;

CLASST 3

CERTIFICAT D'UTILITE 82

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION  
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE:

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

CABINET PLASSERAUD  
84, rue d'Amsterdam  
75009 PARIS

1) TITRE DE L'INVENTION (34)

Nouveaux disaccharides formés de motifs à structure acide  
D-glucuronique et D-glucosamine et procédé pour leur  
préparation

2) DEMANDEUR: NOM ET PRENOMS OU DENOMINATION ET FORME JURIDIQUE: (71)

N° SIRENE, LE CAS ECHÉANT

CHOAY S.A.

4) ADRESSE COMPLETE:

48, avenue Thiers-Gautier  
75782 PARIS CEDEX 16

PAYS

FRANCE

5) INVENTEUR (72)

LE DEMANDEUR EST  
L'INVENTEUR

7) DECLARATION DE PRIORITE (30)

DATE DE DEPOT (32)

NUMERO (33)

Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation de G  
de la demande de Brevet déposée le 20-9-82  
(Article 20 de la Loi de 3 Janvier 1968 modifiée et articles 42 et 43  
du Décret du 19 Septembre 1979)

Nbre

(Req)

(Pub)

Des et Rev

Annexes Doc

Pl. de Dessin

D. Inventeurs

Abrégé

TOTAL

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE:

ADDITIONS ANTERIEURES: 1° N°

2° N°

N°

3° N°

DATE DE DEPOT

4° N°

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

162 82 01

82 158 01 -

Titre de l'invention : Nouveaux disaccharides formés de motifs à structure acide D-glucuronique et D-glucosamine et procédé pour leur préparation.

La Demanderesse CHOAY S.A.

Représentée par son mandataire CABINET PLASSERAUD  
84, rue d'Amsterdam  
75009 PARIS

XXXXXXXXXX

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

CHOAY Jean  
21, rue Saint-Guillaume  
75007 PARIS

JACQUINET Jean-Claude  
1, allée André Gide  
45100 ORLEANS LA SOURCE

PETITOU Maurice  
27, rue du Javelot  
75645 PARIS CEDEX 13

SINAY Pierre  
5, rue Jacques Monod  
45100 ORLEANS

(France)



Date et 20 SEPTEMBRE 1982  
signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

CABINET PLASSERAUD

Par Procuration

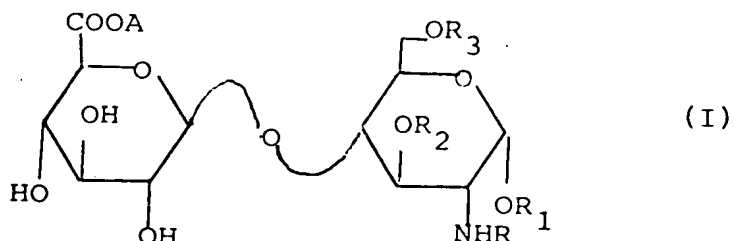
*[Signature]*

Nouveaux disaccharides formés de motifs à structure acide D-glucuronique et D- glucosamine et procédé pour leur préparation

L'invention est relative à de nouveaux disaccharides formés de motifs à structure acide D-glucuronique et D-glucosamine et à un procédé pour leur préparation.

Elle concerne plus particulièrement des disaccharides formés de motifs à structure acide D- glucuronique et N-acyl D-glucosamine.

Ces disaccharides répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle les différents substituants présentent les significations suivantes :

R représente un radical acyle, en particulier un radical acétyle,

R<sub>1</sub> un radical aliphatique ou aromatique, notamment alcoyle, de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier un radical méthyle,

A un atome d'hydrogène, un radical alcoyle de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier un radical méthyle, ou un cation métallique, en particulier un métal alcalin, plus spécialement du sodium,

et R<sub>3</sub> représentent un anion, éventuellement sous forme de sel avec un cation organique ou minéral et, dans ce dernier cas, en particulier un groupe sulfate salifié par un cation d'un métal alcalin, plus spécialement du sodium.

Dans une famille préférée de disaccharides de l'invention, les radicaux R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> représentent des groupes - SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup> et A représente Na<sup>+</sup>.

D'une manière avantageuse, la séquence disaccharidique de l'invention se retrouve dans des fragments ou des fractions d'héparine ou d'héparane-sulfate possédant notamment une activité spécifique anti-Xa (Yin et Wessler) plus élevée que



celle de l'héparine et une activité anticoagulante globale, mesurée selon le titre USP, plus faible.

On rappelle que les titres Yin et Wessler et USP sont définis notamment dans la demande de brevet FR n° 78 31857 du 6 novembre 1978 au nom de la Demanderesse.

Les produits de l'invention sont donc particulièrement intéressants en tant qu'intermédiaires de synthèse pour l'obtention de produits doués d'activité dans des tests de coagulation spécifiques de certains facteurs et plus spécialement du facteur Xa.

Ils sont également avantageusement utilisables comme produits de référence pour l'étude de ce type de structure.

Conformément au procédé de l'invention, les disaccharides définis ci-dessus sont préparés par réaction d'un monosaccharide à structure acide D- glucuronique avec un monosaccharide à structure N-acyl-D-glucosamine répondant aux caractéristiques suivantes.

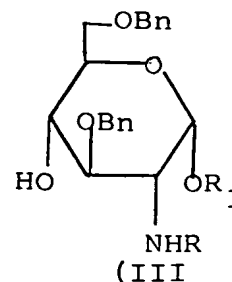
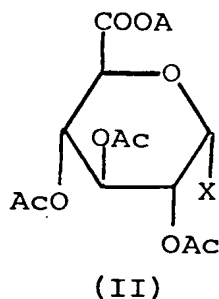
Dans ces composés de départ, toutes les positions sont bloquées excepté celles devant intervenir pour l'établissement de la liaison glycosidique.

Pour l'établissement d'une liaison 1,4  $\beta$ , on a recours à un monosaccharide possédant un groupe réactif en position 1 et à un autre monosaccharide comportant en position 4 un groupe capable de réagir avec le groupe réactif ci-dessus.

Les halogénures du composé à structure acide glucuronique étant aisément accessibles, on base avantageusement la condensation sur la réaction entre l'halogénure du composé en question et l'alcool du disaccharide à structure -glucosamine. Les autres positions de ces monosaccharides sont bloquées par des groupements n'intervenant pas dans la réaction de condensation, compatibles entre eux et éliminables soit à la fois, soit par séquence pour introduire les groupements fonctionnels désirés ou libérer certains groupements -OH. Les positions destinées à être substituées par des anions, en particulier par des groupes sulfate, sont avantageusement substituées par des groupes benzyle et celles qui seront occupées par des groupes -OH sont alors substituées par des groupes acétyle.



Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on fait réagir les monosaccharides de formules (II) et (III)



dans lesquelles :

A représente un groupe alcoyle ;

R<sub>1</sub> et R présentent les significations :

- 5 données ci-dessus, Ac représente un groupe acétyle et X un atome d'halogène, les conditions mises en oeuvre, en particulier de concentration en réactif, de durée et de température étant choisies pour réaliser la condensation désirée.
- 10 On traite ensuite le disaccharide résultant afin d'introduire tout d'abord les anions souhaités en positions 3 et 6 du motif à structure glucosamine. Lorsque ces anions sont en place, on procède alors à l'élimination des groupements acétyle en positions 2, 3 et 4 du motif à structure
- 15 acide glucuronique, avantageusement en utilisant une base forte, ce qui permet également, au cours de la même étape, de salifier les groupes anioniques en positions 3 et 6 évoqués ci-dessus et le groupe carboxyle du motif acide glucuronique.



Les produits intermédiaires mis en oeuvre dans ce procédé sont nouveaux et en tant que tels entrent dans le cadre de l'invention. Ces produits présentent l'avantage de constituer des précurseurs de séquence de base de l'héparine ou de l'héparane-sulfate.

- 25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent. Les formules des composés dont question dans ces exemples sont représentées sur la figure unique dans laquelle les numéros indiqués correspondent à ceux utilisés dans les exemples pour

désigner les mêmes composés. Les symboles utilisés dans ces figures ont les significations suivantes: Ac = acétyle ;  
Me = méthyle, Ts = tosyle.





EXEMPLE 1

Synthèse du monosaccharide 5 ou méthyl 2-acétamido-3-6-di-O-benzyl-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside.

Cette synthèse est effectuée selon les 4 étapes suivantes à partir du monosaccharide 1 préparé selon la technique de A. Neuberger, Journal of Chemical Society 1941, pages 50-51 :

- 1 - benzylation du groupe -OH en position 3.
- 2 - élimination du radical benzylidène aux fins de libération des groupes -OH en positions 4 et 6.
- 10 3 - tosylation du groupe -OH en position 6.
- 4 - benzylation du groupe -OTs en position 6.

Etape 1 : réaction de benzylation.

A une solution du composé 1 (6,5 g, 20,10 mM) dans le diméthylformamide (120 ml), on ajoute de l'hydroxyde de baryum octa-hydrate (3,6 g) et de l'oxyde de baryum (16 g). Après 10 minutes d'agitation à température ambiante, du bromure de benzyle (4,5 ml) est ajouté goutte à goutte. La réaction se poursuit pendant toute une nuit. Après dilution par du chloroforme (100 ml), le mélange réactionnel est

20 filtré sur Célite. Le filtrat est concentré à sec, on obtient ainsi un résidu blanc dont l'analyse en chromatographie sur couche mince indique qu'il contient un seul produit, à savoir le dérivé 2, qui sera engagé tel quel, dans l'étape suivante.

25 Etape 2 : élimination du groupe benzylidène.

Le résidu obtenu ci-dessus est dissous dans un mélange méthanol (370 ml) et d'eau (130 ml). A cette solution, on ajoute de l'acide paratoluène sulfonique monohydrate (3 g), puis on porte le mélange à reflux pendant une heure.

30 Après refroidissement, la majeure partie du méthanol est évaporée, puis de l'eau (250 ml) est ajoutée. Après lavage par une faible quantité de chloroforme (100 ml), la phase aqueuse est soumise au traitement suivant :

- 1°) précipitation des sels de baryum avec de l'acide sulfurique ;
- 35 2°) filtration du sulfate de baryum formé ;



3°) élimination de l'excès d'acide à l'aide d'une résine IRA 45 ( $\text{OH}^-$ ).

Après élimination de la résine et concentration, on obtient un résidu légèrement jaune (5,7 g), à savoir le dérivé 3. Ce dérivé est engagé tel quel dans la préparation du composé 4.

Etape 3 : réaction de tosylation.

Ce dérivé 3 est dissous dans un mélange de dichlorométhane (150 ml) et de DMF (10 ml). A cette solution, on ajoute du chlorure de tosyloxy (5,6 g, 30 mM), puis de la diméthylaminopyridine (121 mg) et enfin de la triéthylamine (5 ml). La réaction évolue à l'abri de l'humidité et sous courant d'azote sec.

Après 18 heures de réaction, on ajoute de l'eau glacée puis on abandonne le mélange sous agitation pendant 14 heures environ.

Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec du dichlorométhane puis la phase dichlorométhane est lavée successivement avec de l'acide chlorhydrique 2M, du bicarbonate de sodium saturé, puis avec de l'eau jusqu'à pH neutre. Après séchage sur sulfate de sodium et filtration, le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur une colonne de gel de silice (200 g) dilué avec un mélange acétate d'éthyle-hexane (4/1, v/v).

Les fractions contenant le dérivé 4 pur sont regroupées.

Après élimination des solvants, on obtient un résidu solide (4,6 g) qui est engagé directement dans la synthèse du composé 5.

Etape 4 : réaction de benzylation.

Le dérivé 4 obtenu ci-dessus est dissous dans du diméthylformamide anhydre (50 ml). A cette solution, on ajoute une solution molaire de benzylate de sodium dans l'alcool benzylique (30 ml). Le mélange est ensuite chauffé à 90°C pendant une heure. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est ensuite concentré à sec.



Il est ensuite repris par du chloroforme (400 ml), la phase chloroformique est lavée avec de l'eau, du chlorure de sodium saturé, séchée, puis concentrée à sec.

Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel  
5 de silice (200 g, chloroforme/acétate d'éthyle, 1/1, v/v).

On obtient ainsi le dérivé 5 (2,3 g). Le rendement par rapport au composé 1 est de 27,6%.

Le composé 5 est cristallin, PF 149-150°C,  $(\alpha)_{20}^D = 87^\circ$  (c=1, chloroforme). L'analyse du spectre infrarouge et  
10 l'analyse élémentaire confirment la structure attendue pour le produit 5.

#### Exemple 2

Synthèse du disaccharide 10.

Cette synthèse comporte :

15 (1) La condensation des dérivés 5 et 6 conduisant au disaccharide 7.

(2) L'élimination des groupes benzyle conduisant au dérivé 8.

(3) La sulfatation des groupes -OH du dérivé 8,  
20 conduisant au dérivé 9, suivie de la salification des groupes anioniques et de l'élimination des groupes acétyle.

1°) Synthèse du disaccharide 7.

Cette synthèse est effectuée à partir des monosaccharides 5 et 6.

25 L'halogénure 6 est préparé selon la technique de G.N. Bollenback et al., Journal of American Chemical Society, 77 (1955), p. 3312.

A une solution de monosaccharide 5 (450 mg, 1,1 mM), dans le dichloroéthane (30 ml), on ajoute du bromure mercurique (400 mg, 1,1 mM). Après distillation d'environ 10 ml de dichloroéthane, on ajoute au mélange réactionnel des tamis moléculaires en poudre (4 Å).

L'halogénure 6 (1,1 g, 2,75 mM) dans du dichloroéthane (10 ml) est alors ajouté. Après distillation de  
35 10 ml de dichloroéthane, le mélange réactionnel est abandonné à reflux pendant environ 14 heures à une température de 90-100°C. Après refroidissement, le mélange réactionnel est dilué par du dichlorométhane (100 ml), puis les solides sont éliminés par filtration sur filtres plissés. La phase



organique est lavée avec une solution de iodure de potassium à 10% (2 x 25 ml), puis avec une solution de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 25 ml) et enfin avec de l'eau jusqu'à pH neutre. Après séchage sur sulfate de sodium, filtration et concentration, le résidu est purifié sur une colonne de gel de silice (150 g), dilué, successivement, avec trois mélanges acétone-éther (1/5 puis 1/4, puis 1/2, v/v).

On obtient ainsi le disaccharide 7 pur (390 mg) sous forme de cristaux. PF = 189-190°C ;  $(\alpha)_{20}^D = + 60^\circ$  (c=0,4 chloroforme). Le spectre infrarouge, de même que le spectre RMN et l'analyse élémentaire, confirment la structure attendue.

#### 2°) Synthèse du disaccharide 8.

A une solution du dérivé 7 (100 mg) dans le méthanol (20 ml), on ajoute du catalyseur (Pd/C, 5%, 100 mg) et on agite la suspension ainsi obtenue sous courant d'hydrogène pendant 3 jours.

Le catalyseur est ensuite éliminé par filtration. Après évaporation, on obtient un résidu (73 mg, 97%) constitué par le disaccharide 8. Le spectre de RMN confirme la structure attendue pour ce composé.

On notera que le disaccharide 8 est le précurseur du motif de base de l'héparane - sulfate. Il suffit pour le déprotéger de le soumettre à une réaction de saponification, comme rapportée ci-après pour l'obtention du dérivé 10 à partir du dérivé 9.

#### 3°) Synthèse du disaccharide 10.

A une solution du composé 8 (70 mg) dans le diméthylformamide (2 ml), on ajoute l'agent de sulfatation (complexe triméthylamine-sulfure-trioxyde) (75 mg). Après une nuit, on procède à une nouvelle addition de complexe (35 mg). Après 6 heures, la réaction est terminée, le mélange est évaporé à sec, repris par du chloroforme, neutralisé avec de la triéthylamine et évaporé.

Une chromatographie sur colonne de gel de silice (20 g, méthanol/chloroforme, 1/2, v/v) permet d'isoler le dérivé 9 sulfaté pur qui se présente sous forme de poudre blanche. Ce dérivé est engagé directement dans la synthèse du disaccharide déprotégé 10.



A une solution du dérivé 9 (71 mg) dans le méthanol (9 ml), on ajoute de l'eau (4 ml) puis, goutte à goutte, une solution de soude 1 M (1 ml). Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est passé sur une colonne d'Amberlite IR 120 H<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est neutralisée puis les sels sont éliminés par passage sur une colonne de Sephadex G25 diluée avec de l'eau. Les fractions contenant le disaccharide sulfaté sont regroupées.

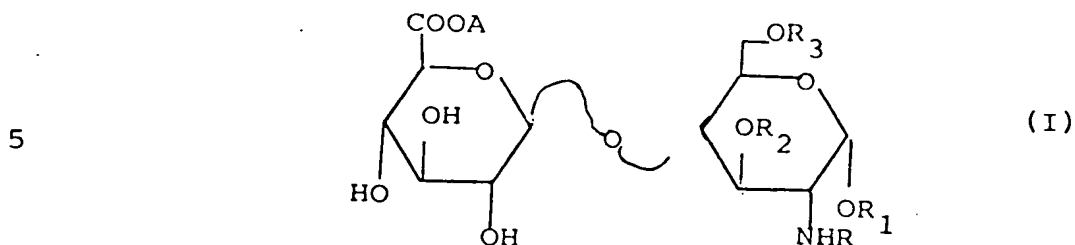
Après lyophilisation, on obtient le dérivé 10 sous forme d'une poudre blanche (46 mg) ( $\alpha$ )<sub>20</sub><sup>D</sup> = 34,5° (c=1, eau).

L'analyse conductimétrique indique pour ce dérivé un rapport sulfate/carboxyle égal à 2. L'analyse élémentaire, de même que l'analyse en RMN du carbone 13, confirment la structure attendue pour ce produit.



REVENDICATION

Disaccharides formés de motifs à structure  
acide D-glucuronique et D-glucosamine, caractérisés en  
ce qu'ils répondent à la formule :



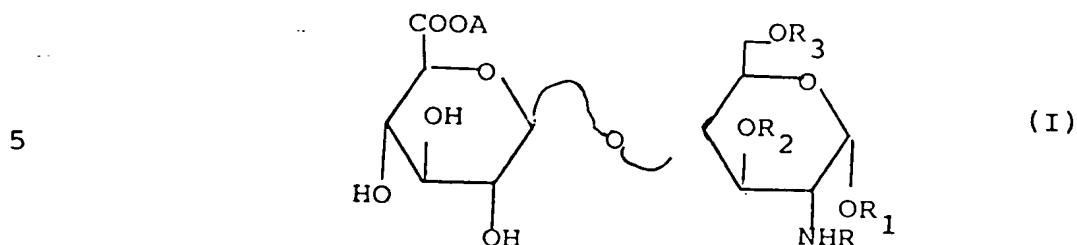
dans laquelle les différents substituants présentent les  
significations suivantes :

- R représente un radical acyle, en particulier un radical  
R représente un radical acyle, en particulier un radical  
10 acétyle,  
R<sub>1</sub> un radical aliphatique ou aromatique, notamment alcoyle, de 1  
à 4 atomes de carbone, en particulier un radical méthyle,  
A un atome d'hydrogène, un radical alcoyle de 1 à 4 atomes  
de carbone, en particulier un radical méthyle, ou un cation  
15 métallique, en particulier un métal alcalin, plus spéciale-  
ment du sodium,  
R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> représentent un anion, éventuellement sous forme  
de sel avec un cation organique ou minéral et, dans ce  
dernier cas, en particulier un groupe sulfate salifié par  
un cation d'un métal alcalin, plus spécialement du sodium.



REVENDICATION

Disaccharides formés de motifs à structure  
acide D-glucuronique et D-glucosamine, caractérisés en  
ce qu'ils répondent à la formule :



dans laquelle les différents substituants présentent les  
significations suivantes :

- R représente un radical acyle, en particulier un radical  
R représente un radical acyle, en particulier un radical  
10 acétyle,  
R<sub>1</sub> un radical aliphatique ou aromatique, notamment alcoyle, de 1  
à 4 atomes de carbone, en particulier un radical méthyle,  
A un atome d'hydrogène, un radical alcoyle de 1 à 4 atomes  
de carbone, en particulier un radical méthyle, ou un cation  
15 métallique, en particulier un métal alcalin, plus spéciale-  
ment du sodium,  
R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> représentent un anion, éventuellement sous forme  
de sel avec un cation organique ou minéral et, dans ce  
dernier cas, en particulier un groupe sulfate salifié par  
un cation d'un métal alcalin, plus spécialement du sodium.



